

**DER KININOGENSPIEGEL UNTER PHYSIOLOGISCHEN
UND PATHOLOGISCHEN BEDINGUNGEN**

Ingrid Jakob

1973

DER KININOGENSPIEGEL UNTER PHYSIOLOGISCHEN
UND PATHOLOGISCHEN BEDINGUNGEN

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der Naturwissenschaft-
lichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität,
München

vorgelegt von
Ingrid Jakob
aus
Schiffweiler-Saar

1973



1. Berichterstatter: Prof. Dr. Dr. E. Werle
 2. Berichterstatter: Prof. Dr. Dr. H. Autrum
- Tag der mündlichen Prüfung: 2.8.1973

Die vorliegende Arbeit wurde unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Dr. E. Werle in der Zeit vom Januar 1970 bis Dezember 1972 am Institut für Klinische Chemie und Biochemie der Universität München durchgeführt.

Danken möchte ich Herrn Prof. Dr. Dr. E. Werle für die Anregung und Förderung dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Dr. H. Autrum danke ich für sein Entgegenkommen, diese Arbeit außerhalb seines Institutes am Institut für Klinische Chemie und Biochemie durchführen zu können.

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
A. EINLEITUNG	1
B. THEORETISCHER TEIL	2
I. Das Kallikrein-Kinin-System	2
1. Geschichtliches	2
2. Zur Chemie des Kallikrein-Kinin-Systems	3
3. Die Pharmakologie des Kallikrein-Kinin-Systems	6
II. Zur Pathophysiologie des Kallikrein-Kinin-Systems	8
1. Die Entzündung	9
2. Der Schock	10
III. Möglichkeiten der Untersuchung der patho-physiologischen Rolle des Kallikrein-Kinin-Systems	11
IV. Aufgabenstellung	14
C. EXPERIMENTELLER TEIL	17
I. Methodik	17
1. Freilegung des Kinins aus Kininogen	17
2. Zur Technik der Testung am biologischen Testobjekt	19
3. Bestimmung des Blutgehaltes in Geweben nach Bücher	20
4. Bestimmung der Serumproteine	20
a. mittels Zelluloseacetatfolie	20
b. Bestimmung des Gesamteiweißes	22
5. Bestimmung der Kininaseaktivität	22

	Seite
6. Versuchsanordnungen	22
7. Einheiten und Material	23
a. Einheiten	23
b. Material	24
II. Ergebnisse	25
1. Der Kininogenspiegel unter physiologischen Bedingungen	25
a. Aus Kininogen freilegbares Bradykinin im Serum	25
b. Aus Kininogen freilegbares Bradykinin im Gewebe	26
c. Aus Kininogen freilegbares Bradykinin in der Niere von Schwein und Rind	28
2. Der Kininogenspiegel unter pathologischen Bedingungen	29
a. Bei Gewebsläsion durch konzentrierte Essigsäure	29
aa. Der Kininogenspiegel während 8 Tagen	29
bb. Der Kininogenspiegel während der ersten 24 Stunden	30
cc. Der Kininogenspiegel im Muskelgewebe	32
b. Artifizielle Entzündung durch Crotonöl	33
c. Veränderungen des Kininogenspiegels im Schock	34
aa. Der Trypsinschock	34
bb. Der Insulinschock	35
cc. Der Elektroschock beim Menschen	36
d. Veränderungen des Kininogenspiegels durch Nebennierenrindenhormone und ACTH	37
e. Versuche zur Hemmung des Kininogenanstieges nach Setzen einer Entzündung	40
aa. durch Cortisol	40

	Seite
bb. durch ein Analgeticum	41
cc. durch einen Proteaseninhibitor	41
f. Verteilung der Serumproteine	42
g. Bestimmung der Kininaseaktivität	44
 D. DISKUSSION	 45
 E. ZUSAMMENFASSUNG	 55
 F. LITERATURVERZEICHNIS	 57
 G. ANHANG ZUR STATISTIK	 66

A. EINLEITUNG

Neben den "klassischen" Hormonen, die in innersekretorischen Drüsen gebildet werden, gibt es noch die Klasse der Gewebshormone, die manches mit den in innersekretorischen Drüsen produzierten Hormonen gemeinsam haben: die Verteilung erfolgt über die Blutbahn. Oft liegen aber die Orte der Freilegung und Wirkung sehr eng beisammen wie bei Acetylcholin und Noradrenalin. Auch Serotonin und Histamin gehören zu diesen Lokalhormonen.

Neben diesen schon länger bekannten Wirkstoffen besitzt der Organismus einen dritten Typ von humoralen Überträgerstoffen, die erst verhältnismäßig spät erkannt wurden, weil die dazugehörigen Substanzen nicht in definierten Geweben oder Zellstrukturen lokalisiert werden können. Es handelt sich um die Angiotensine und Kinine. Die Freisetzung dieser Substanzen erfolgt unter dem Einfluß spezifischer Proteasen. Zu ihrer Entstehung bedarf es ähnlich komplizierter Systeme wie das Gerinnungssystem und das fibrinolytische System.

Die Kinine sind pharmakologisch aktive Peptide, deren Vorstufen als Plasmaproteine zirkulieren. Bildung und Zerstörung laufen dementsprechend humoral ab.

Das ubiquitäre Vorkommen des Kininsystems läßt vermuten, daß es von Bedeutung für die humorale Regelung von Funktionsabläufen ist. Die Beteiligung des Systems an verschiedenen physiologischen und pathologischen Reaktionen des Organismus ist nachgewiesen oder wird diskutiert.

B. THEORETISCHER TEIL

I. Das Kallikrein-Kinin-System

1. Geschichtliches

Im Jahre 1925 fand E.K. Frey (1), daß der Harn von Säugetieren eine Substanz enthält, die nach intravenöser Injektion beim Hund eine Blutdrucksenkung hervorruft. Diese Substanz war eindeutig von den damals bekannten kreislaufaktiven Stoffen wie Histamin und Acetylcholin verschieden. Sie war hochmolekular und thermolabil, sowie empfindlich gegen saure und alkalische Reaktion.

Weitere Untersuchungen ergaben, daß diese für die hypotensive Wirkung verantwortliche Substanz in der Bauchspeicheldrüse in größeren Mengen vorkommt. Sie wurde deshalb Kallikrein genannt, abgeleitet von der griechischen Bezeichnung *καλλιкреας*, für Bauchspeicheldrüse. Kallikrein wurde außerdem im Blutplasma und in anderen Geweben wie in Glandula submaxillaris, Niere und Darmschleimhaut aufgefunden.

E. Werle fand 1936 (2), daß Kallikrein aus einem im Serum vorhandenen Substrat, die eigentliche pharmakologisch aktive Substanz, das Kallidin, freisetzt, die den isolierten Hundedarm und das Meerschweinchenileum kontrahiert, bei dem Kallikrein nur sehr schwach bzw. gar nicht wirksam ist. Trypsin und Schlangengift vermögen eine ähnlich wirksame vasoaktive Substanz, das Bradykinin, aus Serum freizusetzen. 1950 zeigte Werle (3), daß Kallidin und

Bradykinin aus demselben Substrat stammen und sehr nahe verwandt sind. Bradykinin, Kallidin und ähnliche vasoaktive, hypotensive Substanzen werden aufgrund ihrer Fähigkeit, die glatte Muskulatur wie Uterus und Darm zu Kontraktion zu veranlassen, KININE genannt, abgeleitet vom griechischen *κινέω*, ich bewege. Ihre wirksamen Vorstufen werden KININOGENE genannt, die kininabbauenden Enzyme KININASEN.

2. Zur Chemie des Kallikrein-Kinin-Systems

Kallikrein kommt normalerweise in seiner inaktiven Vorstufe, dem Präkallikrein, vor, aus der durch Trypsin und anderen Proteinasen aktives Kallikrein gebildet wird. Das aktive Enzym gehört aufgrund seiner Substratspezifität zur Gruppe der Peptid-Peptidohydrolasen. Die Kallikreine verschiedener Herkunft unterscheiden sich in ihren Molekulargewichten, isoelektrischen Punkten, ihrer elektrophoretischen Wanderungsgeschwindigkeit und ihrer Spaltungsgeschwindigkeit für Substrate. Allen Kallikreinen gemeinsam ist die hochspezifische proteolytische Aktivität, nämlich die Spaltung von Kininogen.

Diese Aktivität ist durch Inhibitoren des Kallikreins hemmbar. Von den Kallikreininhibitoren ist als einziger der Inhibitor aus Rinderorganen polyvalent, er hemmt alle Kallikreine und weiteren Kininogenasen. Die anderen Inhibitoren sind streng spezifisch und können somit zur Differenzierung der einzelnen Kallikreine herangezogen werden.

Das Substrat des Kallikreins und die inaktive Vorstufe der Kinine, das Kininogen, findet sich vor allem im Blutserum und -plasma aller untersuchten Säugetiere. Das Kininogen ist nach Habermann et al. (4) ein saures α -Glycoproteid. Beim Menschen gehört es zu der α_2 - und bei Kaninchen und Rind zur α_1 -Globulinfraktion. Sein Molekulargewicht wird von Pierce und Webster (5) mit $52\,000 \pm 5\,000$ angegeben. Habermann et al. (4, 6) sowie Jacobson und Kriz (7) konnten zwei im Molekulargewicht verschiedene Kininogene isolieren. Beides sind Substrate für kininbildende Enzyme.

Einen Hinweis auf den Ort der Synthese sahen Diniz und Carvalho (8) darin, daß nach CCl_4 -Intoxikation der Leber von Kaninchen der Plasmakininogenspiegel parallel zum Ausmaß der Leberschädigung abfiel.

Die Kinine der Säugetiere erwiesen sich als Peptide mit 9 - 11 Aminosäuren. Ihre Aminosäuresequenz wurde aufgeklärt (9, 10, 11, 12):

Bradykinin

Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro-Phe-Arg

Kallidin

Lys-Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro-Phe-Arg

Methionyl-Lysyl-Bradykinin

Met-Lys-Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro-Phe-Arg

Die Vögel besitzen nach Werle und Mitarb. (13) ein von dem der Säugetiere unterschiedliches Kininogen, Kalli-

krein und Kinin. Ornithokallikrein und -kininogen ist am Säugetierorganismus unwirksam und bewirkt keine Blutdruckänderung; jedoch legt Ornithokallikrein aus seiner Vorstufe im Vogelorganismus Ornithokinin frei.

Auch bei Wirbellosen scheinen die Kinine eine funktionelle Bedeutung zu haben. Bei *Rana temporaria* und anderen Froscharten fand Erspamer (14) ein Kinin, das er als Bradykinin identifizierte.

Aus Tintenfischen wurde ein Peptid mit 11 Aminosäuren isoliert (15), das sogenannte Eledoisin, und aus der Haut von Amphibien das Physalämin (16). Sie haben folgende Aminosäuresequenzen:

Eledoisin

Pyr-Pro-Ser-Lys-Asp-Ala-Phe-Ile-Gly-Leu-Met-NH₂

Physalämin

Pyr-Ala-Asp-Pro-Asn-Lys-Phe-Tyr-Gly-Leu-Met-NH₂

Die biologisch so wirksamen Kinine können rasch abgebaut werden, sie haben eine sehr kurze Halblebenszeit im Organismus (17). Die hauptsächlich kininabbauenden Enzyme erkannten Werle und Mitarb. (18) als Carboxy- und Aminopeptidasen. Ihre Spezifität ist jedoch nicht streng auf Kinine beschränkt, sondern erstreckt sich auch auf andere Substanzen aus der Gruppe der Proteohormone. Das Gebiet der Kininasen hat Erdös übersichtlich dargestellt (19).

In Abbildung 1 ist der Zusammenhang der einzelnen Komponenten aufgezeigt:

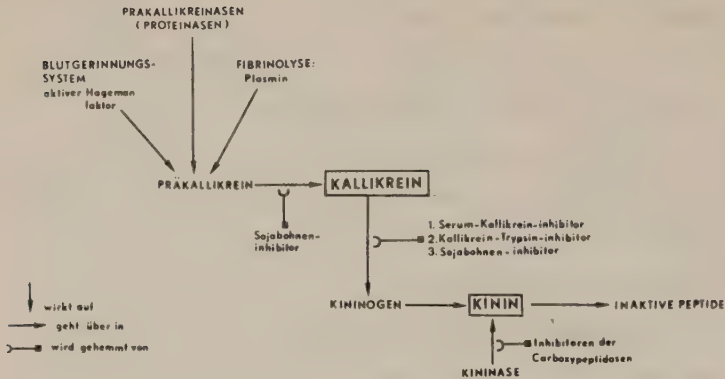


Abb. 1 : Reaktionsschema des Kallikrein-Kinin-Systems

Das System kann sowohl über das Fibrinolyse-System als auch über das Blutgerinnungssystem aktiviert werden. In einem Falle über den aktivierten Hageman-Faktor (20), und im anderen Falle über das aktivierte Plasmin (21, 22). Eine erste Phase des Systems endet mit der Produktion eines oder mehrerer Kallikreine, die in einer zweiten Phase auf eines oder mehrerer Kininogene einwirken und aus ihnen Kinine freilegen, die in der dritten Phase durch kininabbauende Enzyme inaktiviert werden. Das entscheidende Reaktionsprodukt sind dabei die Kinine, denen die pharmakologischen und physiologischen Effekte des Systems zugeordnet werden.

3. Die Pharmakologie des Kallikrein-Kinin-Systems

Im Vordergrund der pharmakologischen Wirkungen stehen periphere Gefäßerweiterung, Erregung glatter Muskulatur,

Vergrößerung und Permeabilitätsänderung der Kapillaren, Mobilisierung und Ansammlung von Leukozyten, Schmerzerzeugung und Blutdrucksenkung (Übersicht bei 1, 23, 24, 25).

Injiziert man Kinine, so verursachen sie Vasodilation bei verschiedenen Gefäßen.

Am intakten und isolierten Herzen erweitern sie die Coronargefäße (26) und greifen an ihnen direkt an (27, 28). Eine vermehrte Haut- und Muskeldurchblutung tritt ebenfalls auf (26, 29). Im Gehirn verursachen Kinine eine Erhöhung des Liquordruckes (26). Außer auf das cardiovascular System wirken die Kinine auch auf die Gefäße endocriner Drüsen (26, 30). Sie senken den mittleren arteriellen Druck und verursachen eine deutliche Vergrößerung der Hypophyse und der Nebennieren (26, 30).

Neben der Vasodilation verursachen die Kinine die Kontraktion der glatten Muskulatur. Eine Bronchokonstriktion in vivo und in vitro ist nach Verabreichung von Bradykinin beim Meerschweinchen am ausgeprägtesten (26, 29, 31, 32, 33). Bei Hunden und Ratten hat sie eine Zunahme der Peristaltik der ableitenden Harnwege zur Folge (34). Bei in vivo Versuchen berichten Winkler et al. (35) über einen Anstieg der Darmkontraktion bei Katzen und Kaninchen. In wenigen Fällen erfolgt jedoch eine Erschlaffung der glatten Muskulatur wie bei dem Rattenduodenum und -coecum. Die Erregung der glatten Muskulatur ist seit der Entdeckung des Kallikreins und der Kinine bis heute die einzige Methode zur quantitativen Erfassung der Kinine.

Hinweise auf die permeabilitätssteigernde Wirkung der Kinine stammen von Schachter (36). Sichtbar gemacht wurde die signifikante Permeabilitätssteigerung durch Bradykinin durch den Radiogoldtest (37). Im Zusammenhang mit der Erhöhung der Gefäßpermeabilität steht eine Ansammlung von Leukozyten (38).

Kinine wirken schmerzerzeugend, wenn sie auf die Basis einer Cantharidenblase aufgetragen werden (29). Armstrong und Keele (39) haben ausführliche Studien über den Zusammenhang zwischen Kininen und Schmerzempfindung am Menschen durchgeführt.

Der durch die Gefäßerweiterung bedingte Blutdruckabfall wird relativ rasch (5 - 10 Min.) normalisiert durch den Kininabbau und die sympathische Gegenregulation (40, 41, 42).

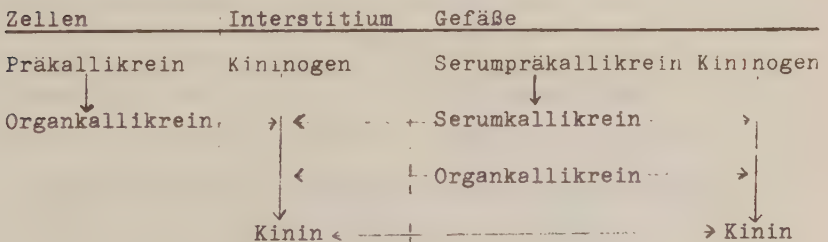
II. Zur Pathophysiologie des Kallikrein-Kinin-Systems

Verschiedene Argumente sprechen für eine Rolle des Kinin-systems bei pathophysiologischen Prozessen; das sind einmal seine pharmakologischen Eigenschaften, zum anderen die Tatsache, daß seine Wirkstoffe hochaktiv und gut abbaufähig sind. Außerdem gibt es eine Reihe von experimentellen Hinweisen auf seine pathophysiologische Bedeutung bei lokalen Entzündungsreaktionen (26, 29), verschiedenen Formen des Schocks (43-46) und akuter Pankreatitis (47, 48, 49).

1. Die Entzündung

Betrachtet man die Kardinalsymptome der Entzündung - rubor, tumor, calor und dolor - wie Celsus sie beschrieb und die Functio laesa (Galen) sowie die Feststellung Waldvogel und Frimmers (50), daß am Ort der Entzündung eine Gefäßerweiterung, eine Erhöhung der Kapillarpermeabilität, eine Leukozytenmigration, eine Störung energieliefernder Prozesse und Schmerz auftritt, so erinnert das an die pharmakologischen Eigenschaften der Kinine.

Rocha e Silva (51) gelang es, Kallikrein und Kinin in entzündlichen Exsudaten nachzuweisen. Lewis (71) und andere Untersucher haben nachgewiesen, daß es im traumatisch geschädigten Gewebe zur Aktivierung von Präkallikreinen mit nachfolgender Liberierung von Kininen kommt. Gleichzeitig werden die Kallikreine des Plasmas aktiviert, die ihrerseits Kinine freilegen. Die Aktivierung der Kallikreine, hochspezifischer Proteasen, erfolgt durch limitierte Proteolyse, die ihrerseits durch begrenzte Proteolyse die Kininliberierung katalysieren. Menkin (52) sieht in der Proteolyse sogar das Hauptgeschehen des Entzündungsprozesses. Diese Zusammenhänge gibt das von Habermann (23) aufgestellte Schema wieder:



Nimmt man die Feststellung Waldvogel und Frimmers, Menkins und die Befunde von Lewis über das Entzündungsgeschehen, so ist eine Beteiligung des Kallikrein-Kinin-Systems wahrscheinlich.

Unwidersprochen ist die pathophysiologische Rolle des Kinins beim thermisch bedingten Rattenpfotenödem (26). Gesichert ist ebenfalls die Beteiligung des Kininsystems bei der Gicht und anderen Arthritiden (53).

2. Der Schock

Als weitere pathophysiologische Rolle des Kinins wird die Beteiligung am Schockgeschehen diskutiert.

Unter Schock versteht man den Zustand der akuten mehr oder weniger allgemeinen Verminderung der Gewebsdurchblutung mit Hypoxydase aufgrund einer arteriellen Hypotension (54). Als Kernsymptom des Schocks wird von anderer Seite die reduzierte Mikrozirkulation genannt, bei deren Zustandekommen von Vasokonstriktion und Vasokompression Proteasen eine führende Rolle spielen.

Rocha e Silva et al. (55) erkannten 1949, daß der durch Trypsin ausgelöste Schock dadurch zustande kam, daß aus dem Blut ein blutdrucksenkendes Polypeptid mit dem Namen Bradykinin liberiert wurde. Schon Jahre vorher war von Werle et al. (56) festgestellt worden, daß die durch Kallikrein auslösbare Blutdrucksenkung auf die gleiche Weise entsteht. Webster und Clark (43) beschrieben eine Aktivierung des Kallikrein-Kinin-Systems im Endotoxin- und haemorrhagischen Schock. Diniz et al. (44, 45) wiesen

auf einen Kininogenabfall im Blut bei verschiedenen Schockformen hin. Werle (48) und der Arbeitskreis um ihn (47) fanden ebenfalls einen Zusammenhang zwischen Schock und Kininogenabfall. Werle und Zach (46) zeigten einen Kininogenabfall im Serum von Ratten im Endotoxin-, Entblutungsschock und anaphylaktischen Schock, während im traumatischen Schock ein Anstieg zu verzeichnen war. Es scheint, daß unabhängig von der Art und Ursache des Schocks den Kininen eine wesentliche Rolle für das pathophysiologische Kreislaufgeschehen zukommt, denn diese Peptide senken in geringen Mengen den Blutdruck schnell und reversibel.

III. Möglichkeiten der Untersuchung der pathophysiologischen Rolle des Kallikrein-Kinin-Systems

Für die Information, ob eine biologisch aktive Substanz bei bestimmten physiologischen oder pathologischen Reaktionen eine Rolle spielt, dient der Nachweis der Veränderung ihrer Konzentrationen im Zusammenhang mit Funktionsabläufen, die ihren pharmakologischen Wirkungen entsprechen. Hier wären der Nachweis von Konzentrationsänderungen von Präkallikrein, Kallikrein, Kininogen, Kinin und der kininabbauenden Enzyme von Interesse.

Genaue Bestimmungen von Präkallikrein und Kallikrein sind sehr schwierig bzw. unmöglich. Präkallikrein ist schlecht erfaßbar, weil es durch viele Faktoren aktiviert werden kann wie durch Verdünnung, Ansäuern, Oberflächenkontakt,

Aceton, Hageman-Faktor u.a.. Aktives Kallikrein kann mit Hilfe einer enzymatischen Methode nur in gereinigtem Zustand gemessen werden. Die biologische Methode, den Kallikreingehalt im Blut durch die Änderung des Blutdrucks am Hund festzustellen, ist aufwendig und zeitraubend.

Die entscheidenden Reaktionsprodukte sind die Kinine. Ihnen ordnen wir alle pharmakologischen Wirkungen zu, bzw. daß alle Effekte der Einzelkomponenten durch deren Bildung bzw. deren Hemmung zustande kommen. Freie Kinine sind jedoch sehr instabil und haben eine extrem kurze Halblebenszeit (17, 57). Der Organismus eliminiert die Kinine, indem er sie mit Hilfe von Enzymen abbaut, die im Blut in reichlicher und aktiver Form vorhanden sind.

Als Ausweg aus diesen Schwierigkeiten bietet sich die Bestimmung des Kininogenspiegels an. Man bestimmt ihn indirekt über Kinine, die man in vitro mit Enzymen erst freisetzt.

Das Problem einer Liberierung des Kinins aus seiner inaktiven Vorstufe besteht darin, daß im Serum ein Inhibitor für Trypsin und Kallikrein anwesend ist. Weiterhin sind Enzyme vorhanden, die einen raschen Abbau der Kinine bewirken. Beide Probleme kann man umgehen, indem man das Serum zur Denaturierung der störenden Enzyme und Inhibitoren in Gegenwart von Säuren erhitzt und so ein Substrat erhält, aus dem man Kinin freilegt. Da eine derartige Behandlung die Empfindlichkeit des Serumkininogens für Kallikrein mindert, kann das Substrat nur auf die freileg-

bare Menge Kinins durch Trypsin geprüft werden.

Nach Liberierung des Kinins mit Trypsin fand man (58) im menschlichen Plasma Peptide, die eine Zunahme der kinin-induzierten Kontraktion am Meerschweinchenileum bewirkten. Diese kininpotenzierenden Peptide traten in Korrelation zu einer kompetitiven Hemmung der Carboxypeptidasaktivität auf (59). Eine solche Potenzierung durch unspezifische Peptide konnte bei der hier angewendeten Methode nicht festgestellt werden. Diese störenden Peptide lassen sich durch Ionenaustauscherchromatographie an Amberlite XE-64 abtrennen. Außerdem scheinen sie nur am Meerschweinchenileum wirksam zu werden (56).

Die Bestimmung des Kininogenspiegels erfolgt unter der Voraussetzung, daß das Kininogen über eine Kininliberierung verschwindet. Sorgfältige Untersuchungen von Dawson (60) zeigten bei der Anaphylaxie der Ratte einen Anstieg des Kininogens mit einem gleichzeitigen Anstieg der freien Kinine.

Die so freigelegten Kinine sind schon in sehr geringen Mengen quantitativ meßbar. Dazu benutzt man ihre pharmakologische Eigenschaft, Meerschweinchenileum und Rattenuterus zu kontrahieren (61). Bei einem Vergleich wurde festgestellt, daß der Rattenuterus empfindlicher reagierte als das Meerschweinchenileum. Die Schwellendosis für den Rattenuterus liegt bei 0.1 - 1.0 ng/1 ml.

Werden Ratten 24 Stunden vorher mit Östrogen (0.5 mg/1 kg Gewicht) behandelt, so sind die Kontraktionen gleichmäßiger und spontane Kontraktionen unterbleiben (62).

Eine andere Komponente des Kininsystems, die als Regulationsmöglichkeit dienen kann, sind die Kininasen. Sie haben Esteraseaktivität und sind so befähigt, Substrate wie Hippuryl-L-Lysin und Hippuryl-L-Arginin zu hydrolysieren (63). Diese Bestimmungsmethode ist nicht anwendbar, wenn die auf Kininaseaktivität zu prüfenden Proben opalisieren, da dies die spektrophotometrische Auswertung stört. Deshalb wird hier vorgezogen, Kinine als natürliches Substrat der Kininasen zu benutzen. So läßt sich die Aktivität der Kininasen durch die in-vitro-Abbaugeschwindigkeit einer vorgegebenen Menge an Bradykinin messen.

IV. Aufgabenstellung

Wegen der diskutierten Schwierigkeiten der Bestimmung physiologischer und pathologischer Konzentrationen der einzelnen Komponenten des Kallikrein-Kinin-Systems sollte sich die vorliegende Arbeit auf die Bestimmung des Kininogens, bzw. in einigen Fällen der Kininaseaktivität beschränken. Um stets vergleichbare Werte zu haben, wurde als Bezugswert immer auf 100 mg Serum- bzw. Gewebsprotein in der Probe bezogen.

Zunächst sollte ein Basiswert für die physiologischen Konzentrationen von Kininogen im Serum ermittelt werden. Bei der Untersuchung an verschiedenen Spezies sollte ein Verteilungsmuster von Kininogen in Organen festgestellt werden. Dabei sollte gleichzeitig die Frage geklärt werden, ob sich in diesen Organen ein Kininogenspeicher befindet, aus dem

Kinin rasch freigesetzt werden kann.

Anhand von zwei Entzündungsmodellen sollten Kininogenkonzentrationsänderungen unter pathophysiologischen Bedingungen festgestellt werden. Gleichzeitig sollte die Rolle des Kallikrein-Kinin-Systems bei Entzündungen wahrscheinlich gemacht werden.

Als experimentelles Modell für die Entzündung wurde hier nicht wie sonst üblich das thermisch bedingte Rattenpfotenödem ausgewählt, sondern einmal eine Gewebsschädigung mit konzentrierter Essigsäure erzielt. Ein anderer Weg war die Entzündungssetzung mit Crotonöl. Als Reaktion auf die Injektion entsteht ein Granulom.

An zwei verschiedenen Schockformen sollte die Beteiligung des Kallikrein-Kinin-Systems unter Erfassung des Kininogenspiegels studiert werden. Dazu wurde der Trypsinschock, der eine Erniedrigung des Kininogenspiegels erwarten läßt, und der Insulinschock ausgewählt.

Als Beweis für die Beteiligung des Kallikrein-Kinin-Systems bei physiologischen und pathologischen Prozessen könnte die gleichzeitige Hemmung der Kininfreisetzung durch spezifische Inhibitoren dienen.

Nach von verschiedenen Seiten erhobenen Befunden könnte ein Kininantagonist unter den Corticosteroiden zu finden sein. Eine umfangreiche Untersuchung mit verschiedenen Nebennierenrindenhormone sollte durchgeführt werden. Verschiedene

Substanzen unter verschiedenen Aspekten standen zur Wahl. Aus der Gruppe der Glucocorticoide wurden Cortisol, Prednisolon, Triamcinolon und Cortison ausgewählt, aus der Gruppe der Mineralcorticoide das Corticosteron. Außerdem wurden noch androgene und gestagene Substanzen auf ihre kininantagonistische Wirkung geprüft. Ebenfalls kam das zur Regulierung der Nebennierenrindenhormone dienende ACTH zur Anwendung.

Bei Cortisol sollte noch seine entzündungshemmende Wirkung bzw. kininantagonistische Wirkung am Modell der Entzündung überprüft werden.

Die Steroidhormone dienen gleichzeitig dazu, um Eingriffe in den Eiweißhaushalt hervorzurufen. So veranlassen die Glucocorticoide eine Proteineinschmelzung und haben daher katabole, d.h. den Proteinabbau begünstigende Wirkung. Die androgenen Steroidhormone haben eine anabole Wirkung, d.h. sie fördern den Proteinaufbau. Gestagene sind schwach katabolisch.

Eventuelle Korrelationen zwischen vermehrtem Kininogengehalt und vermehrtem Proteingehalt sollten aufgedeckt werden.

Eine elektrophoretische Auftrennung der Serumproteine sollte eine Beziehung zwischen Veränderungen der Globulinfractionen und Kininogenkonzentration aufzeigen.

C. EXPERIMENTELLER TEIL

I. Methodik

1. Freilegung des Kinins aus Kininogen

Die Methode ist an die Methode von Diniz und Carvalho (64) angelehnt, an die noch eine Chromatographie mit einem schwach sauren Kationenaustauscher ICR-50 angeschlossen wird (65, 66).

Die Aufbereitung geschieht stets unter Verwendung von Polyäthylengefäßen, um eine Glasaktivierung zu vermeiden.

Blut wird ohne Zusatz von Koagulantien bei 3000 U/Min. 10 Min. lang zentrifugiert.

Eisgekühltes Gewebe, 0.5 bzw. 1.0 g wird bei 0°C in 15 ml 1/10 N Essigsäure bei 20 000 U/Min. im Ultraturrax homogenisiert. Parallel dazu wird eine definierte Menge Gewebes in 20 ml Aqua dest. bei der gleichen Geschwindigkeit und Zeit homogenisiert, dann bei 40 000 U/Min. zentrifugiert. Der Überstand dieses Zentrifugats wird zur Blutbestimmung im Gewebe nach Bücher benutzt.

Von dem Überstand des Blutplasmas wird eine definierte Menge zwischen 0.2 und 0.5 ml zu 5.0 ml 1/10 N Essigsäure gegeben und 30 Min. im siedenden Wasserbad erhitzt.

Nach dem Abkühlen auf Zimmertemperatur wird mit 1.5 ml 0.3 M Tris-Puffer und 2 N NaOH der pH auf 7.8 eingestellt.

Nach Hinzufügen von Trypsin (2 mg/1 ml Plasma) wird 25 Min. bei 37°C im Wasserbad inkubiert.

Die Reaktion wird durch die Zugabe von 1 ml 2 N HCl gestoppt, wobei das Inkubat 25 Min. bei 37°C im Wasserbad belassen wird.

Danach wird mit 2 N NaOH der pH auf 5.5 - 6.0 gebracht.

Gewebe, das nach seiner Homogenisierung mit Essigsäure die gleiche Aufbereitung wie Serum durchlaufen hat, wird jetzt 15 Min. bei 40 000 U/Min. bei 0°C zentrifugiert.

Auf mit 0.1 M Ammonium-acetat-Puffer, pH 6, gewaschene, mit dem Kationenaustauscher XE-64 gefüllte Säulen (4 x 20 mm) wird sowohl der Überstand bei Gewebe als auch das aufbereitete Serum chromatographiert.

Nach dem Waschen mit 10 ml 0.1 M Ammonium-acetat-Puffer, pH 6.0, wird zunächst mit 5 ml 1.0 M, dann mit 0.1 M Ammonium-acetat-Puffer, beide pH 8.6, eluiert.

Bei sofortiger Bestimmung des Kinins muß rasch neutralisiert werden, um einer Zerstörung des Kinins im Alkalischen vorzubeugen. Wird die Probe eingefroren, so werden 2 - 3 Tropfen konzentrierter Essigsäure vorgelegt. Die Proben können so mehrere Wochen ohne Kininverlust eingefroren werden.

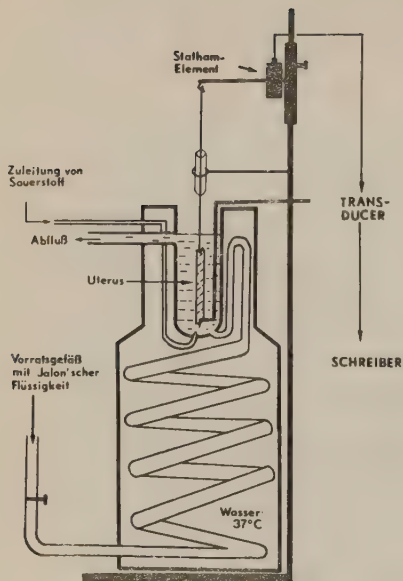
Vor dem Testen am virginellen Rattenuterus werden die Proben aufgetaut, mit NaOH neutralisiert und stets eiskühlt aufbewahrt.

2. Zur Technik der Testung am biologischen Testobjekt

Mit Östrogen (0.5 mg/kg Gewicht) 24 Stunden vorher behandelten virginellen Ratten wurde nach deren Tötung der Uterus entnommen. Zur Testung wurde ein etwa 2 cm langes Stück, von dem jeweils Anfang und Ende entfernt werden, an einer Glashalterung das eine Ende stabil in einem Suspensionsgefäß und das andere Ende beweglich über einen Glasstab an den Haken einer Transducerzelle (Statham Instruments) aufgehängt. Das verstärkte Signal wird auf einem Schreibgerät registriert.

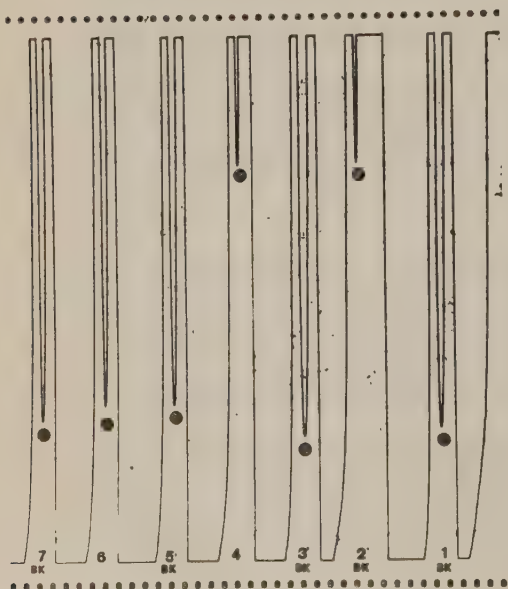
Das Suspensionsgefäß ist mit einer Vorratsflasche mit Jalon'scher Badflüssigkeit mit Zusatz von Atropin (1 mg/10 l) mittels Hahn verbunden, so daß die Flüssigkeit jederzeit erneuert werden kann. Sie wird ständig im Gefäß beheizt und bei 37°C gehalten. O₂/CO₂ (85 : 15 v/v) wird mit gleichmäßigem Druck zugeführt und durch die Badflüssigkeit geperlt.

Kinin vermag den Uterus kurzzeitig zu einer rasch zur Höhe ansteigenden Kontraktion zu veranlassen. Die darauffolgende teilweise Erschlaffung und Kontraktion stehen in Beziehung zur Kininmenge. Bevor eine Auswertung am Uterus stattfindet, werden bekannte Kininmengen eines synthetischen Bradykinins verabreicht und so die Empfindlichkeit des Uterus auf seine Dosisabhängigkeit geprüft;



Meßvorrichtung zur biologischen Kininbestimmung

Abb. 2 : Schematische Darstellung der Meßvorrichtung am isolierten Rattenuterus



- 1 : 16 ng Bradykinin
- 2 : 20 ng Bradykinin
- 3 : 16 ng Bradykinin
- 4 : 0.14 ml eines Ansatzes mit Plasma
- 5 : 16 ng Bradykinin
- 6 : 0.12 ml des Ansatzes
- 7 : 16 ng Bradykinin
- : Umkehrpunkt

Abb. 3 : Uteruskontraktionen

der Umkehrpunkt (siehe Abb. 3) steht in Korrelation zu der gegebenen Bradykininmenge. Nach Gabe von Bradykinin oder der Probe wird der Umkehrpunkt abgewartet und die Lösung mit Jalon'scher Flüssigkeit ausgespült. Der Uterus kehrt zu seinem Ausgangstonus zurück. In regelmäßigen Abständen von 3 Min. werden die Lösungen gespritzt. Vergleichende Standardgaben von synthetischem Bradykinin nach jeder Probe ermöglichen so die Auswertung und Errechnung des unbekannten Kiningehaltes.

3. Bestimmung des Blutgehaltes in Geweben nach Bücher (67)

Parallel zur Kininogenbestimmung wurde neben dem Eiweißgehalt der Blutgehalt der untersuchten Gewebe spektrophotometrisch bestimmt. Nach Homogenisierung (20 000 U/Min.) und Zentrifugation (40 000 U/Min.) in Aqua dest. wird die Extinktion bei 540, 560 und 578 nm im Zeiss-Spektralphotometer gemessen unter Voraussetzung, daß der Oxyhämoglobingehalt HbO_2 des Blutes in der Blutbahn und im Gewebe annähernd gleich ist. Nach Kenntnis des Hämatokrits läßt sich der Plasmagehalt der Gewebe errechnen.

4. Bestimmung der Serumproteine

a. Mittels Zelluloseacetatfolie

Die Trennung der Serumproteine wurde mit dem Modell Mikrophor, Boskamp Gerätebau, durchgeführt. Auf die Zelluloseacetatfolie, Sartorius Membranfilter 25.5 x 145 mm, wurde mit dem Mikrophor-Auftragestempel das unverdünnte Serum aufgetragen. Bei einer Klemmenspannung von 200 V,

einer Stromstärke von 4 mA und einer Laufzeit von 60 Minuten trennten sich die Serumproteine gut auf. Die Kammer war mit Veronal-Natrium-Puffer nach Michaelis (68) gefüllt. Die mit Amidoschwarz angefärbten Streifen wurden auf Objektträger gepreßt und nach Entfärbung mit der Entfärbelösung und nach Behandlung mit Transparenzflüssigkeit der Fa. Boskamp im halbautomatischen Integraphen der Fa. Boskamp ausgewertet.

b. Bestimmung des Gesamteiweißes

Serumeiweiß wurde nach der Biuretmethode bestimmt (69).

5. Bestimmung der Kininaseaktivität

Serum wird 1 : 200 in TRA-Puffer, pH 7.2, verdünnt und mit 30 ng synthetischem Bradykinin (1 ng/0.01 ml TRA-Puffer, pH 7.2) im Wasserbad bei 37°C in Plastikröhrchen inkubiert. Nach 1, 2, 3 usw. Minuten wird die Reaktion der einzelnen Proben im Eisbad gestoppt. Es ist auch möglich, den Abbau des Bradykinins durch Inkubation mit 2 n HCl bei 37°C über 30 Min. zu beenden. Die Austestung des noch verbliebenen Bradykinins erfolgt am isolierten Rattenuterus.

6. Versuchsanordnungen

Die Versuchstiere wurden durch Kopfschlag betäubt und dann entblutet. Menschliches Serum stammte aus der Armvene. Bei Kininogenbestimmungen der Organe wurden diese sofort nach dem Töten entnommen und stets eiskühlt aufbewahrt.

Entzündungen wurden mit 0.1 ml konzentrierter Essigsäure in beide Hinterschenkel von Ratten gesetzt oder mit 0.05 ml Crotonöl. Im Kontrollversuch wurde den Ratten die volumen-analoge Menge an physiologischer Kochsalzlösung ebenfalls i.m. verabreicht.

Bei Auslösung eines Schockes wurde den Ratten in physiologischer Kochsalzlösung aufgelöstes Trypsin zwischen 5 und 15 mg rasch in die Schwanzvene injiziert, bzw. Insulin zwischen 8 und 40 I.E.. Im Kontrollversuch wurde die volumenanaloge Menge an physiologischer Kochsalzlösung ebenfalls in die Schwanzvene injiziert.

Nebennierenrindenhormone und ACTH wurden immer i.m. verabreicht. Im Kontrollversuch kamen die Lösungsmittel der einzelnen Präparate zur Anwendung.

Bei dem Versuch, den Anstieg des Kininogens zu hemmen, wurden die einzelnen "Antagonisten" jeweils vor und nach der Entzündungssetzung i.m. appliziert.

7. Einheiten und Material

a. Einheiten

Die Kinineinheit

Eine Kinineinheit ist diejenige Menge eines Kinins, deren Wirksamkeit am isolierten Rattenuterus der von $1\text{ }\mu\text{g}$ synthetischen Bradykinin entspricht. Da die Wirkung der verschiedenen Kinine bei den verschiedenen pharmakologischen Tests nicht in einem konstanten Verhältnis steht, wird meist auf die wirkungsgleiche Menge synthetischen

Bradykinins bezogen.

Die Kininogeneinheit

Da Kininogen als solches nicht erfaßt wird, wird die aus Kininogen freilegbare Kininmenge angegeben. Sie wird auf die wirkungsgleiche Menge synthetischen Bradykinins bezogen.

b. Material

Bradykinin-BRS 640 wurde von der Fa. Sandoz-Basel, Trypsin (chymotrypsinfrei) als Trypure Novo stabilisiert, 225 000 NF-Einheiten in 50 mg sowie Insulin von der Novo-Industrie, Trasylol^R von der Fa. Bayer bezogen. Zur Elektrophorese wurden Puffer und Lösungen der Fa. Boskamp Gerätebau Hersel und die Filter der Fa. Sartorius, Membranfilterkatalog 11200 25.5 x 145 mm benutzt. Weiters wurden verwendet Hydrocortison (Cortisol) in Kristallsuspension und ACTH der Fa. Hoechst, Cortiron und Proluton "Schering" der Schering AG, Delphicort der Fa. Lederle, Cortison von der Fa. Ciba, Durabolin der Fa. Organon und Decortin-H (Prednisolon) der Fa. Merck. Atropin stammte von der Fa. Delta-Pharma in Reutlingen. Crotonöl wurde von der Andreaea-Noris-Zahn-AG Frankfurt bezogen. Der Kationenaustauscher war Amberlite XE-64 (ICR-50) von der Röhm & Haas Company Philadelphia, bezogen durch die Serva Feinbiochemica in Heidelberg. Alle anderen verwendeten Chemikalien waren vom Reinheitsgrad pro analysi. Die verwendeten Ratten waren vom Stamm Wistar, zwischen

200 g und 250 g schwer und virginell. Sie wurden mit standardisiertem Futter der Marke Altromin ernährt.

II. Ergebnisse

1. Der Kininogenspiegel unter physiologischen Bedingungen

a. Aus Kininogen freilegbares Bradykinin im Serum

Der Gehalt an freilegbarem Bradykinin im Serum der untersuchten Tierarten und des Menschen ist beträchtlich und gut meßbar. Trotz der Schwankungen von Spezies zu Spezies finden sich keine prinzipiellen Unterschiede.

Der niedrigste Wert wurde beim Menschen mit 6.5 ± 1.61 , der höchste beim Meerschweinchen mit $12.67 \pm 2.96 \mu\text{g}$ freilegbaren Bradykinins/100 mg Protein gefunden.

Der Proteingehalt des Serums wies ähnlich große Unterschiede auf.

Tabelle 1

Kininogen- und Proteingehalt im Serum verschiedener Tiere und des Menschen

SPEZIES	FREILEGBARES BRADY- KININ ($\mu\text{g}/100 \text{ mg}$ Protein)	mg PROTEIN/ ml SERUM	VERSUCHS- ANZAHL
RATTE	8.01 ± 3.49	83.95 ± 16.67	62
MEERSCHWEINCHEN	12.67 ± 2.96	56.30 ± 14.05	3
KANINCHEN	8.43 ± 1.27	67.20 ± 12.57	3
RIND	9.00 ± 3.75	42.00 ± 16.17	4
SCHWEIN	8.50 ± 2.20	85.50 ± 12.50	4
MENSCH	6.50 ± 1.61	80.36 ± 21.23	35

b. Aus Kininogen freilegbares Bradykinin im Gewebe

Bei der Untersuchung von Organen der drei Tierarten Kaninchen, Meerschweinchen und Ratte fand sich in allen untersuchten Organen Kininogen. Die Menge des freilegbaren Kinins war unterschiedlich, jedoch weisen alle drei Tierarten eine ähnliche Kininogenverteilung in den einzelnen Organen auf.

Nach dem Serum findet sich bei allen der nächsthöchste Wert in der Lunge, der jedoch nicht annähernd so hoch wie der Serumkininogenwert ist und ungefähr 15 - 20 % dieses Wertes beträgt.

An nächster Stelle steht bei allen drei Tierarten die Niere. Bei Kaninchen und Meerschweinchen folgt dann Leber, Herz und Haut in absteigender Reihenfolge.

Bei Ratten weisen Herz und Haut einen höheren Kininogenwert auf als die Leber.

Tabelle 2

Extravasaler Kininogengehalt in Organen von Kaninchen, Meerschweinchen und Ratte

Tabelle 2a) Kaninchen (n=3)

ORGAN	FREILEGBARES BRADYKININ ($\mu\text{g}/100 \text{ mg Protein}$)	% BLUTANTEIL	mg PROTEIN / g GEWEBE
Lunge	2.07 ± 0.31	7.5	84 - 140
Niere	1.05 ± 0.32	2.8	46 - 110
Leber	0.69 ± 0.09	4.5	147 - 210
Herz	0.43 ± 0.15	2.84	117 - 157
Haut	0.43 ± 0.14	-	101 - 112

Tabelle 2b) Meerschweinchen (n=3)

ORGAN	FREILEGBARES BRADY- KININ *	% BLUTAN- ANTEIL	mg PROTEIN / g GEWEBE
Lunge	2.65 $\pm$ 1.53	5.2	91 - 120
Niere	0.86 $\pm$ 0.19	3.1	105 - 136
Leber	0.76 $\pm$ 0.21	3.86	220 - 280
Herz	0.38 $\pm$ 0.05	2.9	86 - 115
Haut	0.51 $\pm$ 0.01	-	180 - 232

Hämatokrit: 45

Tabelle 2c) Ratte (n=3)

ORGAN	FREILEGBARES BRADY- KININ*	% BLUTAN- ANTEIL	mg PROTEIN / g GEWEBE
Lunge	1.22 $\pm$ 0.45	12.5	135 - 176
Niere	0.84 $\pm$ 0.14	1.3	132 - 141
Leber	0.47 $\pm$ 0.10	7.8	156 - 238
Herz	0.68 $\pm$ 0.14	3.2	145 - 179
Haut	0.48 $\pm$ 0.08	-	112 - 190

Hämatokrit: 45

*angegeben in μg / 100 mg Protein

Der Blutanteil der Haut konnte methodisch nicht mehr erfaßt werden, er war zu gering.

c. Aus Kininogen freilegbares Bradykinin in der Niere
von Schwein und Rind

Bei der Untersuchung der Organe fand sich in der Niere
der drei untersuchten Tierarten nach der Lunge der höchst
Kininogenwert.

Eine Untersuchung der zwei verschiedenen Gewebearten der
Niere ergab beim Rind in beiden eine ähnliche Kininogen-
verteilung in Mark und Rinde.

Bei der Schweineniere enthielt das Mark ungefähr doppelt
so viel freilegbares Kinin wie die Rinde.

Tabelle 3

Der extravasale Kininogengehalt in der Niere von Schwein und
Rind, angegeben in μg freilegbarem Bradykinin/100 mg Protein

	RINDE	MARK
RIND	1.45 ± 0.48	1.79 ± 0.46
SCHWEIN	0.42 ± 0.17	1.28 ± 0.30

Die Versuchsanzahl betrug für jedes Tier $n=4$.

2. Der Kininogenspiegel unter pathologischen Bedingungen

a. Bei Gewebsläsion durch konzentrierte Essigsäure

aa. Der Kininogenspiegel während 8 Tagen

Nach intramuskulärer Injektion von 0.1 ml konzentrierter Essigsäure in die Hinterschenkel von Ratten beobachtet man nach zwei bis drei Tagen eine starke Nekrosebildung an der Injektionsstelle. Ein Anstieg des Kininogens auf ungefähr das Dreifache des Normalwertes wurde schon nach 24 Stunden, der kürzesten Versuchsdauer, im Serum gemessen.

Wie Abbildung 4 zeigt, blieb der Kininogenspiegel dann während 8 Tagen p.i. auf dem hohen Niveau konstant.

Der Kininogenspiegel der mit physiologischer Kochsalzlösung behandelten Kontrollgruppe blieb während der 8 Tage auf dem Normalniveau.

Der Gesamtproteingehalt des Serums der mit Essigsäure behandelten Gruppe sowie der Kontrollgruppe blieb während der Versuchsdauer unverändert (Signifikanz $p > 0.80$).

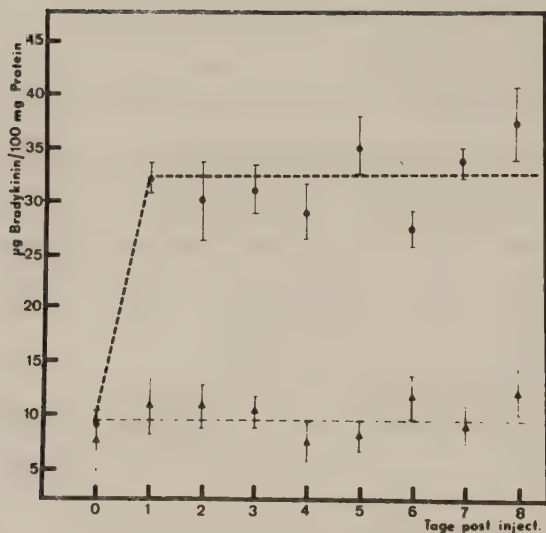


Abb. 4 : Der Kininogenspiegel im Serum von Ratten
nach Injektion von Essigsäure.

-- ● -- nach Essigsäuregabe -- ▲ -- Kontrollwerte
(Mittelwerte mit Standardabweichung)

bb. Der Kininogenspiegel während der ersten 24 Stunden

Differenzierte Untersuchungen der ersten 24 Stunden nach Injektion von Essigsäure ergaben, daß der Kininogenspiegel bereits nach 12 - 15 Stunden auf das Doppelte angestiegen war. In den darauffolgenden

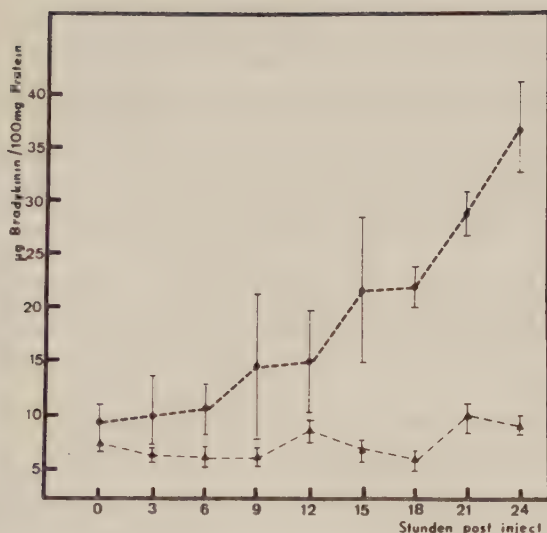


Abb. 5 : Der Kininogenspiegel im Serum von Ratten nach
Injektion von Essigsäure

---●--- nach Essigsäure

---▲--- Kontrollwerte

(Mittelwerte mit Standardabweichung) n=6

8 Stunden stieg der Spiegel weiter steil an und erreichte nach 14 Stunden sein Maximum, wie schon Abbildung 5 zeigt. Der Proteingehalt beider Gruppen blieb konstant und unterschied sich nicht signifikant vom Normalwert.

cc. Der Kininogenspiegel im Muskelgewebe

Bei der Untersuchung der "lokalen" Kininogenverhältnisse um die Injektionsstelle mit Essigsäure im Hinterschenkelmuskel der Ratte war der Kininogengehalt des mit Essigsäure behandelten Muskels um das Doppelte so hoch wie der des Kontrollversuches mit physiologischer Kochsalzlösung (Signifikanz $p < 0.001$).

Der Eiweißgehalt des geschädigten, nekrotischen Gewebes war jedoch mehr als um die Hälfte abgesunken.

($p < 0.001$).

Im Serum unterschied sich der Proteinspiegel nicht von dem der Kontrollgruppe ($p > 0.10$), während sich der Serumkininogenspiegel auf ca. das Vierfache erhöht hatte ($p < 0.001$).

Tabelle 4

Der Kininogen- und Proteingehalt im Muskelgewebe und Serum nach Injektion von Essigsäure

Behandlungsart	Material	Freilegbares Bradykinin*	mg Protein/ g Gewebe	Versuchsanzahl
ESSIGSÄURE- INJEKTION	MUSKEL	1.73 ± 0.36	104.0 ± 5.6	10
	SERUM	36.58 ± 5.89	76.3 ± 3.8	10
KOCHSALZ- INJEKTION	MUSKEL	0.99 ± 0.13	273.2 ± 44.9	10
	SERUM	6.22 ± 0.45	71.5 ± 1.34	10

*angegeben in μg freilegbares Bradykinin / 100 mg Protein

b. Artifizielle Entzündung durch Crotonöl

Nach intramuskulärer Injektion von 0.05 ml Crotonöl in die Hinterschlenkel von Ratten, stieg der Kininogenspiegel im Serum nach 24 Stunden auf ungefähr das Dreifache seines Kontrollwertes mit physiologischer Kochsalzlösung an ($p < 0.001$).

Eine makroskopische Veränderung des Gewebes wie bei der Injektion von Essigsäure wurde nicht beobachtet.

Der Proteingehalt des Serums beider Gruppen unterschied sich nicht signifikant ($p > 0.10$).

Tabelle 5

Der Kininogen- und Proteingehalt im Serum von Ratten nach Injektion von Crotonöl

Behandlungs- art	Freilegbares Bradykinin*	mg Protein/ ml Serum	Versuchs- anzahl
Crotonöl (0.05 ml)	24.54 $\pm$ 9.19	95.06 $\pm$ 10.88	20
Kochsalzlsg. (0.05 ml)	7.20 $\pm$ 2.30	82.97 $\pm$ 7.27	10

*angegeben in μg Bradykinin / 100 mg Protein

c. Veränderungen des Kininogenspiegels durch Schock

aa. Der Trypsinschock

Injiziert man Ratten Trypsin rasch in die Schwanzvene, so zeigen sie je nach injizierter Menge Symptome des Schocks wie Verkrampfung, flache Atmung, Zittern, Sich-auf-die-Seite-legen, worauf dann meistens sehr rasch der Exitus eintritt.

Der Serumkininogenspiegel steigt hier in Abhängigkeit von der Dosis bis zu einem gewissen Maximum. Dieses Maximum ist abhängig von der Dosis Trypsin; mehr als 15mg waren unverträglich und wirkten binnen 30 Sekunden tödlich. Die Tiere wurden entblutet, als sich die Symptome des Schocks zeigten.

Im Kontrollversuch wurde den Ratten volumenanaloge Mengen physiologischer Kochsalzlösung injiziert. Der Kininogenspiegel blieb während dieses Eingriffs unverändert.

Der Gesamtproteingehalt des Serums zeigte keine signifikanten Veränderungen.

In Abbildung 6 ist der Anstieg des Serumkininogens graphisch dargestellt. Die Mittelwerte wurden aus 6 bzw. aus 4 Versuchen pro Dosis Trypsin errechnet.

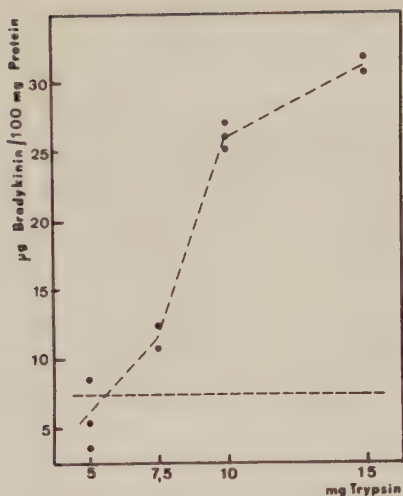


Abb. 6 : Der Kininogenspiegel im Trypsinschock

--- mit Trypsin ----- mit physiol. NaCl

bb. Der Insulinschock

Trotz sehr hoher Dosis an Insulin war keine eindeutige Abhängigkeit zwischen Dosis und ansteigendem Kininogenspiegel zu erkennen.

Eine Erhöhung der Serumkininogene ergab sich bei Verabreichung von 24 - 40 I.E. Insulin.

Der Eiweißspiegel blieb in beiden Gruppen unverändert. Der Kontrollwert für Serumkininogene, durchgeführt mit volumenanaloger physiologischer Kochsalzlösung, blieb ebenfalls auf dem Normalniveau.

Tabelle 6

Der Kininogenspiegel im Insulinschock

Dosis I.E.	Freilegbares Bradykinin*	Minuten nach Injektion	Versuchsanzahl
8	14.25 $\pm$ 5.85	10	6
10	7.48 $\pm$ 2.11	10	6
12	7.95 $\pm$ 1.80	10	6
14	5.35 $\pm$ 1.08	10	6
16	6.35 $\pm$ 0.96	10	6
20	4.75 $\pm$ 1.23	10	6
24	19.70 $\pm$ 2.01	10	6
32	14.70 $\pm$ 1.56	10	6
40	15.90 $\pm$ 1.92	10	6
NaCl	8.80 $\pm$ 1.32	10	8

*angegeben in μg Bradykinin / 100 mg Protein

cc. Der Elektroschock beim Menschen

Untersuchungen an menschlichen Seren über den Kininogenspiegel ergaben keinen Unterschied zwischen Seren von Probanden ohne und nach Elektroschock. Selbst eine Häufung des Elektroschocks am gleichen Probanden veränderte den Kininogenspiegel nicht signifikant.

Auch der Proteinspiegel blieb in allen drei Untersuchungsgruppen unverändert.

Tabelle 7

Der Kininogen- und Proteingehalt im Serum nach Elektroschock
beim Menschen

	FREILEGBARES BRADY- KININ ($\mu\text{g}/100 \text{ mg}$ PROTEIN)	mg PROTEIN/ ml SERUM	n
Normalserum	6.50 ± 1.61	80.36 ± 21.23	35
Patienten vor dem Schock	6.48 ± 2.08	79.56 ± 22.70	20
nach dem Schock	6.98 ± 1.64	91.08 ± 18.32	10
gehäufter Schock (3x)	6.0 ± 2.39	85.40 ± 13.20	10

d. Veränderungen des Kininogenspiegels durch Nebennieren-
rindenhormone und ACTH

Bei den Untersuchungen der Frage, ob einzelne, von außen
zugeführte Corticosteroide eine Einwirkung auf den Serum-
kininogenspiegel der Ratte haben, fand sich keine be-
merkenswerte Änderung des Gehaltes an Kininogen im Serum
gegenüber der Norm.

Die geringe Erhöhung, die nach Verabreichung verschiedener
Mengen von Cortisol (Hydrocortison) gefunden wurde, er-
wies sich bei der Berechnung als nicht signifikant
($p < 0.02$ und $p > 0.01$).

Glucocorticoide wie Prednisolon, Triamcinolon und Cortison
scheinen ebenfalls ohne Wirkung auf den Serumkininogen-

Tabelle 8

Der Kininogengehalt im Serum von Ratten nach Verabreichung von Nebennierenrindenhormonen und ACTH

PRÄPARAT	DAUER (Tage)	DOSIS mg/200g Ratte	FREILEGBARES BRADYKININ μ g/ 100 mg Protein	VERSUCHS- ANZAHL
Hydrocortison (Cortisol)	10	1.0	11.12 ± 7.51	11
	10	2.5	11.02 ± 5.66	22
Decortin-H (Prednisolon)	10	0.5	8.40 ± 2.07	8
	10	5.0	7.20 ± 1.3	5
Cortison	10	5.0	9.51 ± 1.89	6
Delphicort (Triamcinolon)	10	2.5	10.02 ± 6.07	18
Cortiron	10	5.0	9.5 ± 0.37	6
Durabolin (Androgen)	10	1.35	5.26 ± 1.8	6
	3	0.1	5.97 ± 1.47	6
Proluton (Gestagen)	10	5.0	6.25 ± 1.13	7
	3	1.0	6.68 ± 1.20	6

ACTH	10	0.5 I.E.	17.16 ± 2.70	10
------	----	----------	------------------	----

gehalt zu sein. Das Mineralcorticosteroid Corticosteron (Cortiron-Schering) und das Gestagen (Proluton "Schering") veränderten den Kininogenspiegel in keiner Weise.

Einen geringen Abfall zeigte der Kininogenspiegel nach Verabreichung des androgenen Steroids Nortestosteron (Durabolin Schering), der jedoch nur eine geringe Signifikanz aufweist ($p > 0.002$) für eine Dosis von 1.35 mg/200 g Ratte. Bei einer niedrigeren Dosis von 0.1 mg/200 g Ratte war der Abfall von ähnlicher Größe und von der gleichen Signifikanz.

In allen Fällen blieb der Serumproteinspiegel unverändert, obwohl katabole und anabole Substanzen verabreicht wurden.

Der Serumkininogenspiegel der Kontrolltiere, denen jeweils die volumenanaloge Menge des Lösungsmittels des Präparates verabreicht wurde, war in allen Versuchen normal.

Tabelle 8 gibt die im einzelnen aufgefundenen Werte an.

Auffallend waren drei Tiere, die nach Injektion von 2.5 mg/200 g Ratte Cortisol 25 - 40 g an Gewicht verloren, ein struppiges Fell bekamen und sich apathisch verhielten.

Bei diesen Tieren ergaben sich Werte von 130, 103 und 64 μg freilegbaren Bradykinin/100 mg Protein für das Serum, was das 10 - 20fache des Normalwertes ausmacht. Gleichzeitig war der Serumproteinspiegel um etwa 40 % reduziert. Trotz gleicher Versuchsanordnung waren die Werte bei anderen Ratten nicht reproduzierbar.

Einen signifikanten Kininogenanstieg ($p < 0.001$) verursachte das Hypophysenhormon ACTH, welches Einfluß auf die Biosynthese der Corticosteroide hat. Die Werte sind ebenfalls in Tabelle 8 angegeben.

e. Versuche zur Hemmung des Kininogenanstieges nach Setzen einer Entzündung

aa. Durch Cortisol

Intramuskuläre Gaben von Cortisol (Hydrocortison), dem wirkungsvollsten Entzündungshemmer, vor und nach der Entzündungsauslösung durch Crotonöl konnten den Anstieg des Serumkininogens nicht hemmen ($p > 0.30$).

Tabelle 9

Der Kininogen- und Proteingehalt nach Verabreichung von Crotonöl und Cortisol im Serum der Ratte

	Freilegbares Bradykinin*	mg Protein/ ml Serum	n
2.5 mg Cortisol	7.2 ± 1.3	90.90 ± 10.16	8
0.05 ml Crotonöl	24.54 ± 9.19	87.97 ± 7.22	10
Cortisol + Crotonöl	26.8 ± 3.4	85.70 ± 4.79	10

* $\mu\text{g}/100 \text{ mg Protein}$

bb. Durch ein Analgetikum

5 %ige Natriumsalicylatlösung, intramuskulär verabreicht, blieb ebenfalls ohne Wirkung auf den erhöhten, durch Crotonöl induzierten Kininogenspiegel im Blut. Auch eine Erhöhung der Dosis an Natriumsalicylat blieb ohne Effekt.

Tabelle 10

Der Serumkininogengehalt nach Gabe von Natriumsalicylat und Crotonöl im Serum der Ratte

	Freilegbares Bradykinin*	mg Protein/ 1 ml Serum	Versuchs- anzahl
5 %iges Natriumsalicylat	8.67 $\pm$ 3.46	89.50 $\pm$ 10.14	10
Crotonöl (0.05 ml)	24.54 $\pm$ 9.19	87.97 $\pm$ 7.22	10
Natriumsalicylat + Crotonöl			
0.05 ml Na-sal.	22.5 $\pm$ 0.1	88.31 $\pm$ 6.3	4
0.10 ml Na-sal.	21.7 $\pm$ 2.3	83.40 $\pm$ 13.4	4
0.15 ml Na-sal.	24.8 $\pm$ 1.2	92.52 $\pm$ 5.5	4
0.20 ml Na-sal.	19.8 $\pm$ 0.9	89.10 $\pm$ 7.8	4

* μ g/100 mg Protein

cc. Durch einen Proteaseninhibitor

Der Proteaseninhibitor Trasylol^(R) wurde zur besseren Resorption intraperitoneal gegeben. Eine geringe Sen-

kung des Kininogenspiegels zeichnet sich bei 10 000 - 20 000 K.I.E. (Kallikreininhibitor-Einheiten) ab ($p > 0.05$). Diese Kininogenwerte liegen jedoch immer noch weit über dem Normalwert.

Der Proteingehalt wies jedoch keine Veränderung auf.

Tabelle 11

Der Kininogen- und Proteingehalt nach Verabreichung des Proteasen-inhibitors Trasylol^(R) im Serum der Ratte

	Freilegbares Bradykinin *	mg Protein/ 1 ml Serum	Versuchs- anzahl
Crotonöl	24.52 $\pm$ 9.19	87.97 $\pm$ 7.22	10
Trasylol ^R + Crotonöl			
1 000 K.I.E.	19.41 $\pm$ 3.8	86.0 $\pm$ 17.3	4
5 000 K.I.E.	27.3 $\pm$ 2.54	92.7 $\pm$ 9.12	4
10 000 K.I.E.	14.06 $\pm$ 0.6	81.5 $\pm$ 7.5	4
20 000 K.I.E.	14.10 $\pm$ 4.66	79.3 $\pm$ 9.4	4

* μ g/100 mg Protein

f. Verteilung der Serumproteine

Bei einem elektrophoretischen Vergleich der Serumproteine von Normalserum zu Serum mit erhöhtem, durch Entzündung induziertem Kininogenspiegel ergaben sich nur wenig signifikante Unterschiede. Die Albumine sind geringfügig reduziert, α_1 -Globuline etwas erhöht, α_2 -Globuline fast um

das Doppelte angestiegen, alle anderen Fraktionen weisen keine signifikanten Unterschiede auf.

Bei einer hohen Sicherheitswahrscheinlichkeit von 99,99 % ist nur die α_2 -Globulinfraktion signifikant verschieden.

Bei einer Sicherheitswahrscheinlichkeit von 98 % sind die Albumine ebenfalls signifikant verschieden, diese signifikante Verschiedenheit ist jedoch bei einer Sicherheitswahrscheinlichkeit von 99,99 % nicht mehr aufrechtzuerhalten.

Vergleicht man das Gesamtserumprotein von gesunden Tieren mit dem von Tieren mit experimentell gesetzten Entzündungen wie mittels Crotonöl und Essigsäure, so unterscheidet sich keine der Gruppen signifikant voneinander. Alle Werte liegen auf dem Normalniveau.

Tabelle 12

Serumproteinfraktionen von gesundem und entzündungsinduziertem Serum (die Zahlen sind Relativprozent)

	SEREN MIT ERHÖHTEM SPIEGEL	NORMAL-SEREN
Albumin	45.64 $\pm$ 9.66	50.61 $\pm$ 5.58
α_1	10.13 $\pm$ 8.06	7.08 $\pm$ 2.44
α_2	10.55 $\pm$ 4.44	6.74 $\pm$ 1.81
α_3	5.29 $\pm$ 1.48	4.97 $\pm$ 1.46
β	19.07 $\pm$ 5.58	20.55 $\pm$ 4.82
γ	12.76 $\pm$ 4.30	13.78 $\pm$ 7.9
Anzahl	n=30	n=30

g. Bestimmung der Kininaseaktivität

Bei einigen Seren wurde die in-vitro-Abbaugeschwindigkeit von Bradykinin durch die Kininasen des Serums bestimmt. Die Ratten waren verschieden vorbehandelt.

Tabelle 13

Inaktivierungszeit der Serumkininase für 15 ng Bradykinin

SERUM	MINUTEN	n
Normalserum	5.37 $\pm$ 1.60	8
Essigsäureserum	10.72 $\pm$ 0.61	8
ACTHserum	5.80 $\pm$ 1.22	8
Gestagenserum	6.74 $\pm$ 0.50	8

Die Werte geben die Zeiten für die Inaktivierung von 15 ng Bradykinin an.

Die Werte sind Mittelwerte aus je 8 Versuchen.

Eine Abweichung vom Kontrollwert weist nur der Wert für die Seren der mit Essigsäure behandelten Ratten auf. Er zeigt eine deutliche Verminderung der Kininaseaktivität.

D. DISKUSSION

Das Kallikrein-Kinin-System ist seit seiner Entdeckung oft und unter den verschiedensten Bedingungen untersucht worden. In vielen Punkten herrscht Klarheit, jedoch sind auch Diskrepanzen in der Literatur zu verzeichnen. Aus diesem Grund wurden auch Werte, die schon in der Literatur angegeben sind, hier neu ermittelt.

Der Kininogenspiegel unter physiologischen Bedingungen

Werle und Hambüchen (70) wiesen bereits 1943 auf den hohen Kininogengehalt des menschlichen Plasmas hin. Die ersten vergleichenden Messungen über Kininogengehalt im Plasma verschiedener Tiere stammen von Diniz und Carvalho (71). Sie unterscheiden sich jedoch von denen unseres Labors. Es ist unerheblich, ob Plasma oder Serum verwandt wird, denn bei Serum fehlt im wesentlichen nur das Fibrinogen. Kininogen ist ein α -Glycoprotein.

Während Diniz z.B. für Ratten einen Serumkininogenwert von $2.0 \mu\text{g}$ Bradykinin/1 ml Plasma angibt (was bei einer Umrechnung auf 100 mg Protein ungefähr $3 \mu\text{g}$ ausmachen würde) liegen meine Werte bei $8.01 \pm 3.49 \mu\text{g}$ freilegbaren Bradykinins/100 mg Protein. Diese Unterschiede können sich aus der verwendeten Kininogenase sowie der analytischen Technik ergeben. Die Kininausbeute mit Trypsin als Kininogenase liegt etwa viermal so hoch wie mit Kallikrein (72).

Bei der verwendeten Technik handelt es sich zwar meist um Variationen der Methode nach Diniz und Carvalho (64), jedoch wird hier noch eine Säulenchromatographie angeschlossen,

die mehrere Funktionen hat. Sie ermöglicht einmal die Isolierung eines gereinigteren Kinins, und zum anderen werden an ICR-50 die kininpotenzierenden Peptide nicht absorbiert (73). Die so ermittelten Werte erscheinen mir deshalb zuverlässiger. Auch die Beziehung der freigelegten Menge an Bradykinin auf 100 mg Protein ist sinnvoller, da bei dem von Spezies zu Spezies schwankenden Proteingehalt im Serum (siehe Tabelle 1) ein Vergleich der einzelnen Werte so besser möglich ist.

Ausgedehntere Bestimmungen über den Kininogengehalt in Organen von Tieren stammen von Sardesai (74). Übereinstimmend mit ihm wurde in allen untersuchten Organen Kininogen gefunden; jedoch weicht die Reihenfolge der Kininogenverteilung beträchtlich von der hier gefundenen ab. Sardesai fand die höchste Menge an Kininogen im Herzmuskel, dann in absteigender Reihenfolge in der Leber, Niere und Gehirn. Die Unterschiede können sich aus verschiedenen Gründen ergeben; Sardesai verwendete als Ausgangsmaterial Acetontrockenpulver. Außerdem ist nicht bekannt, ob der Blutgehalt der Organe bei den Messungen berücksichtigt wurde. Vergleichsweise sind unsere Werte aus frischen, eisgekühlten Organen gewonnen, bei denen nur der extravasale Kininogengehalt berechnet wurde. So können die Ergebnisse von Sardesai nur orientierende Gültigkeit haben.

Werle und Zach (46) untersuchten noch Jejunum, Milz, Hirn und Pankreas. Sie fanden überall Kininogen. Ebenfalls fand ich im Muskelgewebe der Ratte Kininogen, und zwar mehr als in Niere, Leber, Herz und Haut.

An erster Stelle stand jedoch bei allen drei untersuchten Tierarten die Lunge, was um so erstaunlicher ist, da nach Diniz et al. (8) die Leber als wahrscheinlichster Ort der Kininogensynthese gilt. Hinweise auf ein "Depot" ergaben sich jedoch nicht.

Die Tatsache, daß in allen untersuchten Organen Kininogen gefunden wurde entspricht der Vorstellung, die man sich von der physiologischen Funktion des Kallikrein-Kinin-Systems macht: die Regelung der Gefäßerweiterung in Haut, Jejunum und Muskel (26, 29), und im Gehirn zur Mehrdurchblutung (26). Der hohe Kininogengehalt der Niere steht wahrscheinlich im Zusammenhang mit dem Vorkommen von Kallikrein und freiem Kinin in Niere und Harn (75). Bei der Auftrennung der Niere in Mark und Rinde ließen sich beim Rind keine größeren Unterschiede finden; das Mark enthielt mehr Kininogen als die Rinde, beim Schwein war es sogar ungefähr doppelt soviel (Tab. 3).

Pathophysiologie

Nach Eisen et al. (53), Greenbaum et al. (76), Hegner (77) und Lewis (78) gibt jede Gewebsschädigung den Anstoß zur Kininfreilegung, da Lysate von Leukozyten bzw. Lysosomen ebenfalls kininbildende sowie kininzerstörende Enzyme enthalten. Eine Beteiligung des Kininsystems bei entzündlichen Prozessen gilt bisher nur beim thermisch bedingten Rattenpfotenödem (26) sowie bei Gicht (53) als gesichert. Die Tatsache, daß bei einer experimentell gesetzten Gewebsschädigung mit konzentrierter Essigsäure der Kininogenspiegel des Serums auf das 3- bis 5-fache des Normalwertes

in 24 Stunden gestiegen war, stützt die These, daß jede Gewebsschädigung den Anstoß zur Kininfreilegung gibt, sowie das Ergebnis, daß bei einem zweiten Typus der Entzündung, verursacht durch Crotonöl, der Serumkininogenspiegel ebenfalls nach 24 Stunden signifikant angestiegen war (Tab. 5).

Nach Zachariae und Oates (79) kommt es in hitzegeschädigtem Gewebe zu einem erniedrigten pH, sowie zu einer Verminderung der Kininaseaktivität und der Kallikreininhibitoren. Dieses Freiwerden von Proteasen infolge Acidierung paßt wiederum zum Bild des Entzündungsgeschehens wie Menkins (52) es vorschlägt, indem er die Entzündung als Proteolyse auffaßt.

Auch Edery und Lewis erheben den Befund (80), daß der erniedrigte pH den Kininabbau hemmt, wobei die Kininbildung nicht beeinträchtigt ist. Für einen Teil dieser Theorien spricht der hier erhobene Befund, daß die Kininaseaktivität im Serum von essigsäurebehandelten Ratten gegenüber dem Normalserum vermindert war (Tab. 13).

Bleibt man bei der Auffassung, daß die Entzündung ein proteolytischer Prozeß ist, so sollte er durch den Trypsin-Kallikrein-Inhibitor Trasylol^R hemmbar sein; wofür einige Versuche dieser Arbeit sprechen (Tab. 11). Die Hemmung war jedoch nicht vollständig, aber die Höhe des Kininogenspiegels war deutlich vermindert.

Bei der Untersuchung der lokalen Kininogenverhältnisse am Ort der Entzündung fand sich im nekrotischen Gewebe trotz Verminderung des Proteins etwa doppelt soviel Kininogen

wie im gesunden Muskel. Denkt man dabei an die Befunde von Lewis (38), nämlich die Leukozytenmigration und Ansammlung am Ort der Entzündung, sowie daran, daß Leukozyten kininbildende und -zerstörende Enzyme enthalten, wird der hohe Kininogengehalt im geschädigten Gewebe verständlich.

Schock

Die Meinungen über Verschiebungen des Kininogengehaltes bei Schockzuständen sind nicht einheitlich. Wie schon erwähnt, wurde meistens ein Kininogenabfall registriert.

Habermann (81) untersuchte einige Schockformen und stellte fest, daß er in den meisten Fällen keinen meßbaren Abfall des Kininogens konstatieren konnte, sondern daß der Proteingehalt gesunken war und so der Abfall des Kininogens mit dem Abfall des Proteins korreliert war.

Überraschenderweise wurde hier für den Trypsinschock eine signifikante Zunahme an Kininogen festgestellt, die eine gewisse Linearität zur gegebenen Menge an Trypsin aufweist bzw. zur Stärke des Schocks.

Diese Linearität blieb nicht beim Insulinschock sichtbar; jedoch war auch hier bei einer größeren Dosis von 24 - 40 I.E./Ratte der Kininogenspiegel auf das Doppelte gestiegen. Der Anstieg des Kininogens paßt wesentlich besser zum Bild des Schocks, das man sich heute von ihm macht (Übersicht bei 82), nach dem es zu einer Acidose im Gewebe unter Anderem kommt. Ähnlich wie bei der Entzündung könnte hier durch die pH-Verschiebung die Wirkung von Kallikreininhibitoren vermindert sein und so eine Proteolyse einleiten.

Der Elektroschock beim Menschen wies hingegen keine Änderung des Kininogenspiegels auf. Das mag einmal seine Ursache darin haben, daß mit sehr geringer Stärke an Elektrizität gearbeitet wird, ein anderes Mal daran, daß die Acidierung bei dieser Art von Schock ausbleibt. Der Anstieg der Fibrinolyseaktivität (83) nach Elektroschock reicht offenbar nicht aus, eine Aktivierung des Kininsystems herbeizuführen. Ein zweiter Aktivierungsfaktor, nämlich Plasmin, bleibt während des Elektroschocks unverändert (83).

Im Gegensatz zu den Beobachtungen von Habermann (80), der einen Proteinabfall beim Schock konstatierte, blieb in den hier untersuchten Fällen der Serumproteinspiegel unverändert auf dem Normalniveau.

Einige Parameter sind für Schock und Entzündung gleich wie Acidose, Proteolysentätigkeit und erhöhte Kapillarpermeabilität. Speziell für das Schockgeschehen trifft u.A. die Vasodilation und eine verminderte Herzleistung zu, denn diese vasoaktiven Peptide senken bereits in Dosen von wenigen Mikrogramm schnell und reversibel den Blutdruck. Die weitgehende Übereinstimmung zwischen den Effekten des Kinins und diesen pathophysiologischen Prozessen macht seine Beteiligung an ihnen im Zusammenhang mit den hier erhobenen Befunden an ihnen wahrscheinlich.

Nebennierenhormone und ACTH

Shimamoto stellte fest, daß Östrogene in vivo Kininantagonisten sein können. Diese Untersuchungen gehen auf Beob-

achtungen von Lurie et al. (84) bzw. Bonta et al. (85) zurück.

In vitro Versuche dazu stammen von Cline und Melmon (86, 87), die eine Hemmung der Kininliberierung durch Cortisol beobachteten. Des weiteren beobachteten sie, daß aus Blut von prednisolonbehandelten Patienten kein Kinin mehr entwickelt werden konnte (88).

Nach den umfassenden Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit konnte ich keine signifikante Senkung durch Corticoide bei in vivo Versuchen beobachten, was Eisen et al. (89) durch in vitro Versuche zumindest für die Hemmversuche mit Cortisol und Prednisolon bestätigen. Die Glucocorticoide wie Cortison und Triamcinolon, sowie das Mineralcorticoid Cortiron blieben ohne Effekt auf den Kininogenspiegel.

Wieggershausen et al. (90) stellten einen Anstieg des Plasma-kininogens mit fortschreitender Gestation bei der Ratte fest. Bei Injektion von Progesteron von 5 und 1 mg/Ratte über 10 bzw. 3 Tage konnte dieser Effekt nicht wiederholt werden, was in Einklang mit den Befunden von McCormick (91) steht, der nach Verabreichung von 100 µg, 0.5 mg und 1 mg/Ratte ebenfalls keine Veränderung des Kininogenspiegels fand. McCormick untersuchte außerdem noch die Wirkung von Testosteron in Mengen von 10, 50 und 100 µg/Ratte. Während er bei allen drei Dosen einen signifikanten Abfall des Plasmakininogens fand, kam ich zu anderen Ergebnissen: der Kininogenspiegel weist zwar einen geringen Abfall auf, der sich bei der statistischen Berechnung als nur schwach signifikant erweist ($0.05 > p < 0.025$). Vergleicht man die Dosiswirkung

von Östrogen, das nur in geringen Mengen einen Anstieg des Kininogens hervorruft und in höheren Dosen unwirksam ist (McCormick), so könnten die Verhältnisse bei Testosteron ähnlich liegen. McCormick hat wesentlich geringere Mengen an Testosteron angewendet. Diese Befunde stützen die These von Shimamoto (92), der eine Hemmung der durch Bradykinin hervorgerufenen erhöhte Kapillarpermeabilität durch Östrogen nur in einem ganz bestimmten Kinin-Östrogen-Mischverhältnis fand.

Diese Ergebnisse machen wahrscheinlich, daß unter den Steroidhormonen sich kein spezifischer Kininantagonist befindet.

Nicht zu erklären ist der signifikante Anstieg ($p < 0.001$) des Kininogens nach Verabreichung von ACTH, dem Stimulans für die Produktion von Nebennierenrindenhormone. Dabei wirkt ACTH nicht auf das gesamte Hormonspektrum gleichzeitig, sondern überwiegend auf die 11-17-O-Steroide wie Cortisol und Cortison, die einzeln injiziert ohne Wirkung auf den Kininogenspiegel waren. Bei einem Zusammenwirken beider Steroide wäre auch eher eine Senkung des Kininogens zu erwarten. Die Kininaseaktivität im Serum zeigt keinen signifikanten Unterschied zu der des Normalserums.

Versuche zur Hemmung

Nach den Ergebnissen dieser Arbeit mit Nebennierenhormonen war eine entzündungshemmende Wirkung dieser Gruppe in einer Kombination Entzündung und entzündungshemmendes Steroid nicht zu erwarten. Es wurde dazu Cortisol ausgewählt, dem

die stärkste entzündungshemmende Wirkung zugesprochen wird. Eine Erniedrigung des durch Crotonöl induzierten hohen Kininogenspiegels konnte nicht erreicht werden. Man kann daher annehmen, daß die entzündungshemmende Wirkung von Cortisol nicht über eine Blockierung des Kininsystems läuft, sondern sich der Meinung von Bonta (93) anschließen, daß diese Substanzgruppe die Dämpfung der Gefäßpermeabilität durch direkte Wirkung auf die Gefäßwand erreicht und mit einer spezifischen Kininblockierung nichts zu tun hat.

Ähnliche Ergebnisse erbrachten auch Versuche mit 5 %igem Natriumsalicylat. Über positive Ergebnisse wurde von mehreren Autoren berichtet, sowohl für in vitro als auch in vivo Versuche (94 - 97). Collier et al. (31, 32) fanden zunächst, daß i.v. applizierte Acetylsalicylsäure die kinininduzierte Bronchokonstriktion beim Meerschweinchen blockierte. Bei einer anderen Tierspezies bleibt diese Wirkung jedoch aus (33). Auch mein Befund, daß Natriumsalicylat allein ohne Einfluß auf den Kininogenspiegel bleibt, sowie ihn in der Kombination mit einer Entzündung nicht zu senken vermag, spricht dagegen, es als Kininblocker anzusehen.

Bei der Behandlung von Entzündungen unter dem Gesichtspunkt der Beteiligung proteolytischer Enzyme, erwartet man von einem Proteaseninhibitor Erfolge. Bei hohen Dosen wie 10 000 und 20 000 Kallikrein-Inhibitor-Einheiten scheint die durch Entzündung induzierte Kininogenspiegelerhöhung tatsächlich vermindert, wenn auch nicht völlig aufgehoben. Die geringe Signifikanz $p < 0.05$ rührt wahrscheinlich einmal von der

nicht sehr großen Stichprobenanzahl her, ein andermal daher, daß der Inhibitor außer Kallikrein und Trypsin auch noch andere Proteasen inhibiert, und so anderweitig "verbraucht" wird. Die Tatsache, daß der durch eine Entzündung hervorgerufene hohe Kininogengehalt durch einen spezifischen oder doch teilweise spezifischen Inhibitor erniedrigt wird, kann als ein weiterer Hinweis für die Beteiligung des Kininsystems bei entzündlichen Prozessen dienen.

Serumproteine

Bei der elektrophoretischen Auftrennung der Serumproteine ergab sich eine Erniedrigung der Albumine und eine signifikante Erhöhung der α_2 -Globulinfraktion.

Die Albumine sind in der Regel bei allen pathologischen Zuständen verringert, was sich auch hier wieder zeigt. Bemerkenswert ist hier der Zusammenhang zwischen erhöhtem Kininogenspiegel und erhöhter α_2 -Globulinfraktion. Kininogen gehört beim Rind zur α_1 - und beim Menschen zur α_2 -Globulinfraktion. Bei der Ratte ist es mit großer Wahrscheinlichkeit in der α_2 -Fraktion lokalisiert. Die Korrelation zwischen entzündlichem Prozeß und Anstieg der α_2 -Fraktion, zu der offenbar das Kininogen der Ratte gehört, könnte als weiterer Beweis für die Beteiligung des Kininsystems herangezogen werden.

E. ZUSAMMENFASSUNG

Bei der Untersuchung des Kininogengehaltes in Serum und Gewebe bei verschiedenen Spezies wurde der höchste Kininogengehalt stets im Serum aller untersuchten Tierarten gefunden. In allen untersuchten Organen fand sich Kininogen, dessen Gehalt jedoch höchstens 20 % des Serumkininogenswertes beträgt. Alle drei untersuchten Tierarten Meerschweinchen, Kaninchen und Ratte wiesen ein ähnliches Verteilungsmuster auf. Nach dem Serum fand sich der höchste Wert in der Lunge, dann in der Niere. Ein Hinweis auf einen besonderen Kininogenspeicher ergab sich nicht.

Nach einer mit Essigsäure oder Crotonöl induzierten Entzündung steigt der Kininogengehalt im Serum auf das 2- bis 4-fache an. Die Höchstwerte sind nach 24 Stunden erreicht und bleiben über 8 Tage konstant. Gleichzeitig ist die α_2 -Globulinfraktion signifikant vermehrt. Dieser entzündungsinduzierte hohe Serumkininogenspiegel ist durch einen spezifischen Proteaseninhibitor, wie ihn der Kallikrein-Trypsin-Inhibitor darstellt teilweise hemmbar. Diese Befunde lassen die Beteiligung des Kallikrein-Kinin-Systems bei entzündlichen Prozessen wahrscheinlich erscheinen.

Im Trypsin- und Insulinschock war ein Anstieg des Serumkininogens feststellbar.

Nach eingehenden Messungen nach Zufuhr von Nebennierenrindenhormonen ist es unwahrscheinlich, daß unter diesen

Steroidhormonen ein Kininantagonist zu finden ist. Die entzündungshemmende Wirkung von Cortisol läuft nicht über die Hemmung des Kallikrein-Kinin-Systems.

Ein erhöhter Kininogenspiegel ist nicht mit einem erhöhten Gesamteiweißspiegel korreliert. Bei Entzündungen war der Serumgesamteiweißgehalt nicht verschieden vom Normalwert, jedoch waren die Albumine vermindert zugunsten der Globuline. Auffallend war der signifikante Anstieg der α_2 -Globulinfraktion, der Fraktion des Kininogens.

F. LITERATURVERZEICHNIS

1. Frey, K.E., Kraut, H., Werle, E., Vogel R., Zickgraf-Rüdel
G. und Trautschold, I.
Das Kallikrein-Kinin-System und seine Inhibitoren.
Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart (1968)
2. Werle, E.
Klin. Wschr. 15, 848 (1936)
3. Werle, E., Kehl, R. und Koebke, K.
Biochem. Z. 320, 372 (1950)
4. Habermann, E., Klett, W. und Rosenbusch, G.
Z. physiol. Chem. 332, 121 (1963)
5. Pierce, J.V. und Webster, M.E. in
Hypotensive Peptides, S. 130, Springer-Verlag,
New York (1966)
6. Habermann, E. und Blennemann, G.
Arch. exper. Path. Pharmacol. 247, 324 (1964)
7. Jacobsen, S. und Kriz, M.
Brit. J. Pharmacol. 29, 25 (1967)
8. Diniz, C.R. und Carvalho, I.F.
Ann. N.Y. Acad. Sci. 104, 77 (1963)
9. Elliot, D.F., Lewis G.P. und Horton, E.W.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 3, 87 (1960)
10. Pierce, J.V. und Webster, M.E.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 5, 353 (1961)

11. Werle, E., Trautschold, I. und Leysath, G.
Z. physiol. Chem. 326, 174 (1961)
12. Elliot, D.F. und Lewis, G.P.
Biochem. J. 95, 437 (1965)
13. Werle, E. und Hürter, J.
Biochem. Z. 285, 175 (1936)
14. Anastasi, A., Erspamer, V. und Bertacchini, G.
Comp. Biochem. Physiol. 14, 43 (1965)
15. Erspamer, V., Bertacchini, G. und Cei, J.M.
Experientia 20, 489 (1964)
16. Erspamer, V. und Anastasi, A.
Experientia 18, 58 (1962)
17. Gautvik, K.M. und Rugstad, H.E.
Brit. J. Pharmacol. 31, 390 (1967)
18. Werle, E., Kehl, R. und Koebke, K.
Biochem. Z. 321, 213 (1950)
19. Erdös, E.G.
Adv. Pharmacol. 4, 1 (1966)
20. Margolis, J.
Ann. N.Y. Acad. Sci. 104, 133 (1963)
21. Back, N., Guth, P.S. und Munson, A.E.
Ann. N.Y. Acad. Sci. 104, 53 (1963)
22. Back, N., Munson, A.E. und Guth, P.S.
J. Am. Med. Assoc. 183, 260 (1963)

23. Habermann, E.

Arch. exp. Path. Pharmacol. 245, 230 (1963)

24. Lewis, G.P.

Physiol. Rev. 40, 647 (1960)

25. Trautschold, I. und Rüdell, G.

Klin. Wsch. 41, 297 (1963)

26. Rocha e Silva, M.

Ann. N.Y. Acad. Sci. 104, 190 (1963)

27. Parrat, J.R.

Brit. J. Pharmacol. 22, 34 (1964)

28. Lochner, W. und Parrat, J.R.

Brit. J. Pharmacol. 26, 17 (1966)

29. Elliot, D.F., Horton, E.W. und Lewis, G.P.

J. Physiol. 153, 473 (1960)

30. Feldberg, W. und Lewis, G.P.

J. Physiol. 178, 239 (1965)

31. Collier, H.O.J., Holgate, J.A., Schachter, M.

und Shorley, P.G.

Brit. J. Pharmacol. 15, 290 (1960)

32. Shorley, P.G. und Collier, H.O.J.

Nature 188, 999 (1960)

33. Bhoola, K.D., Collier, H.O.J., Schachter, M.

und Shorley, P.G.

Brit. J. Pharmacol. 19, 190 (1962)

34. Catacutan-Labay, P. und Boyarsky, S.
Science 151, 78 (1966)
35. Winkler, M., Bauer, G. und Gmeiner, R.
Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Path. Pharmacol.
250, 459 (1965)
36. Schachter, M. in
Schachter M.: Polypeptides, S. 239, Pergamon
Press, London (1960)
37. Frimmer, M.
Arch. exp. Path. Pharmacol. 245, 287 (1963)
38. Lewis, G.P.
Nature 192, 596 (1961)
39. Keele, C.A. und Armstrong, D. in
Substances Producing Pain and Itch,
Edward Arnold Ltd., London (1964)
40. Gersmeyer, E.F. und Spitzbarth, H.
Klin. Wschr. 39, 1227 (1961)
41. Page I. und Ohnsted, H. u. F.
Amer. J. Physiol. 201, 92 (1961)
42. Saameli, K. und Eskes, T.
Fed. Proc. 21, 400 (1962)
43. Webster, M.E. und Clark, W.R.
Amer. J. Physiol. 197, 406 (1959)
44. Diniz, C.R. und Carvalho, I.F.
Ann. N.Y. Acad. Sci. 104, 77 (1963)

45. Corrado, A.P., Reis, M.L. Carvalho, I.F. und Diniz, C.R.
Bioch. Pharmacol. 15, 959 (1966)
46. Werle, E. und Zach, P.
Z. Klin. Chem. und Klin. Biochem. 8, 186 (1970)
47. Trautschold, I., Werle, E. und Fritz, H. in
Hypotensives Peptides, S. 221, Springer-Verlag
New York (1966)
48. Werle, E. in
Neue Aspekte der Trasyloltherapie, Bd. I, S. 176,
Schattauer-Verlag, Stuttgart (1965)
49. Creutzfeld, W. in
Neue Aspekte der Trasyloltherapie Bd. III, S. 89,
Schattauer-Verlag, Stuttgart (1968)
50. Waldvogel, G. und Frimmer, M.
Arch. exp. Path. Pharmacol. 258, 321 (1967)
51. Rocha e Silva, M. und Rosenthal, S.R.
J. Pharmacol. exp. Ther. 132, 110 (1961)
52. Menkin, V.
Int. Arch. Allergy 4, 131 (1953)
53. Eisen, V. und Keele, C.A.
Biochem. Pharmacol. 14, 1390 (1965)
54. Buchborn, E. in
Klinik und Therapie der Kollapszustände, S. 47,
Schattauer-Verlag, Stuttgart (1962)

55. Rocha e Silva, M., Beraldo, W.T. und Rosenfeld, G.
Amer. J. Physiol. 156, 261 (1949)
56. Werle, E., Götze, N. und Keppler, A.
Biochem. Z. 289, 217 (1937)
57. Habermann, E.
Dtsch. med. Wschr. 93, 40 (1968)
58. Hamberg, U., Elg, P. und Stelwagen, P.
Adv. exp. med. biol. 2, 626 (1968)
59. Hamberg, U.
Ann. N.Y. Acad. Sci. 146, 157 (1968)
60. Dawson, W., Starr, M.S. und West, G.B.
J. Physiol. 180, 14P (1965)
61. Werle, E. in
Polypeptides which Stimulate Plain Muscle, S. 20
E. u. S. Livingstone, Edinburgh 1955
62. Horton, E.W.
J. Physiol. 148, 267 (1959)
63. Erdös, E.G., Sloane, E.M. und Wohler, J.M.
Bioch. Pharmacol. 13, 893 (1964)
64. Diniz, C.R. Carvalho, I.F., Ryan, J. und Rocha e Silva, M.
Nature 192, 1194 (1961)
65. Andrade, S.O. und Rocha e Silva, M.
Biochem. J. 64, 701 (1957)
66. Merryfield, R.B.
Biochemistry 3, 1385 (1964)

67. Hohorst, H.J., Kreutz, F.H. und Bücher, Th.
Biochem. Z. 332, 18 (1959)
68. Michaelis, L.
J. biol. Chem. 87, 33 (1930)
69. Reinhold, J.G.
Standard Methods of Clinical Chemistry 1, 88 (1952)
70. Werle, E. und Hambuechen, R.
Arch. exp. Path. Pharmacol. 201, 311 (1943)
71. Diniz, C.R. und Carvalho, I.F.
Ann. N.Y. Acad. Sci. 104, 77 (1963)
72. Trautschold, I.
Habilitationsschrift der Medizinischen Fakultät
der Universität München (1965)
73. Hamberg, U., Elg, P. und Stelwagen, P.
Scand. clin. Lab. Invest. 107, 21 (1969)
74. Sardesai, V.M.
Can. J. Phys. and Pharm. 46, 77 (1968)
75. Werle, E. und Vogel, R.
Arch. int. Pharmacodyn. 126, 171 (1960)
76. Greenbaum, L.M. und Yamafuji, K.
Biochem. Pharmacol. 14, 1392 (1965)
77. Hegner, D., Frimmer, M. und Schischke, H.
Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Path.
Pharmak. 253, 43 (1966)

78. Lewis, G.P.

Ann. N.Y. Acad. Sci. 104, 236 (1963)

79. Zachariae, H. und Oates, J.A.

J. invest. Derm. 47, 493 (1966)

80. Edery, H. und Lewis, G.P.

J. Physiol. 160, 20 P (1962)

81. Habermann, E. in

Neue Aspekte der Trasyololtherapie Bd. III, S. 37,
Schattauer-Verlag, Stuttgart (1968)

82. Haberland, E. in

Neue Aspekte der Trasyololtherapie Bd. V, S. 1
Schattauer-Verlag, Stuttgart (1971)

83. Hilden, M. und Lauritsen, O.

Scand. J. clin. Lab. Invest. 28, 435 (1971)

84. Lurie, M.B.

Ann. N.Y. Acad. Sci. 52, 1074 (1950)

85. Bonta, I.L. und De Vos, G.

Acta endocr. 49, 403 (1965)

86. Melmon, K.L. und Cline, M.J.

Nature 215, 90 (1967)

87. Cline, M.J. und Melmon, K.L. in

III. Pharmacol. Congress Symp. on Vasoactive
Polypeptides, Sao Paulo (1966)

88. Cline, M.J. und Melmon, K.L.

Science 153, 1135 (1966)

89. Eisen, V., Greenbaum, L. und Lewis G.P.
Brit. J. Pharmacol. 34, 169 (1968)
90. Wiegiershausen, B., Kläusch, G., Henninghausen, G.
und Sosat, R.
Experientia 24, 1128 (1967)
91. McCormick, J.T. und Senior, J.
Brit. J. Pharmacol. 43, 421 P (1971)
92. Ishioko, T., Honda, Y., Sagara, A. und Shimamoto, T.
Acta endocr. 60, 177 (1969)
93. Bonta, I.L.
Acta physiol. pharmacol. Neerl. 15, 188 (1969)
94. Gryglewski, R.J., Panczenko, B., Gorka, Z., Chytkowski, A.
und Zmuda, A.
Dissert. Pharm. Pharmacol. 21, 1 (1969)
95. Adams, S., McCullough, K.F. und Nicholson, J.S.
Arch. internat. pharmacodyn. 178, 115 (1969)
96. Martelli, E.A.
J. Pharm. Pharmacol. 19, 617 (1967)
97. Starr, M.S. und West, G.B.
Brit. J. Pharmacol. 31, 178 (1967)

G. ANHANG ZUR STATISTIK

Alle Rechnungen wurden mit dem Olivetti-Tischcomputer ausgeführt.

Die Berechnungen des Mittelwertes für ungruppierte Werte und der Standardabweichung erfolgten über folgende Formeln:

für die Standardabweichung s

$$s = \sqrt{\frac{1}{N-1} \sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2}$$

für den Mittelwert $\bar{x}$

$$\bar{x} = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N x_i$$

Für den Vergleich zweier Mittelwerte unverbundener Stichproben mit verschiedenen Varianzen wurde der T-Test angewendet. Die Testgröße T, die eine Studentsche t-Verteilung mit $(N_1 + N_2 - 2)$ Freiheitsgraden hat, wurde nach der Formel

$$T = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{\sqrt{\frac{(N_1 - 1) s_1^2 + (N_2 - 1) s_2^2}{N_1 + N_2 - 2} \left(\frac{1}{N_1} + \frac{1}{N_2} \right)}}$$

Verwendete Symbole

$\bar{x}$	=	Mittelwert
s	=	Standardabweichung
N	=	Stichprobenumfang
T	=	Prüfgröße für die Differenz zweier Stichproben- mittelwerte
p	=	Signifikanz
$\bar{x}_1, s_1, N_1$	=	Mittelwert, Standardabweichung und Umfang der ersten Stichprobe
$\bar{x}_2, s_2, N_2$	=	Mittelwert, Standardabweichung und Umfang der zweiten Stichprobe

Lebenslauf

Am 19. März 1943 wurde ich in Schiffweiler-Saar geboren, als Tochter des Rechtsanwaltes und Syndikus Dr. Wilhelm Jakob († 1972) und seiner Ehefrau Katharina, geb. Wilbertz.

Am gleichen Ort besuchte ich von Herbst 1949 bis Ostern 1954 die dortige Volksschule. Anschließend wechselte ich auf das Progymnasium und Lyzeum der Ursulinen in Boppard/Rhein über. Ab 1957 besuchte ich das Neusprachliche Mädchen-gymnasium der Ursulinen St. Maximin in Trier/Mosel, wo ich 1963 die Reifeprüfung ablegte.

Im Wintersemester 1963/64 schrieb ich mich an der Universität München in den Fächern Biologie, Chemie und Genetik ein. Das Studium setzte ich später in Saarbrücken, Kiel und Graz fort. Im Januar 1970 begann ich mit der Doktorarbeit im Institut für Klinische Chemie und Biochemie der Universität München unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. Dr. E. Werle. Im Sommersemester 1972 legte ich zusätzlich die Diplom-Vorprüfung für Studierende der Biologie an der Universität München ab.

